

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平1-502590

⑬ 公表 平成1年(1989)9月7日

⑭ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 9/10  
B 01 J 13/02識別記号  
3 2 7庁内整理番号  
F-7417-4C  
Z-8317-4C審査請求 未請求  
予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全 17 頁)

⑯ 発明の名称 循環時間の長いリボソーム

⑰ 特 願 昭63-500988

⑱ 出 願 昭62(1987)12月21日

⑲ 翻訳文提出日 昭63(1988)8月24日

⑳ 国際出願 PCT/US87/03398

㉑ 国際公開番号 WO88/04924

㉒ 国際公開日 昭63(1988)7月14日

優先権主張 ㉓ 1988年12月24日 ㉔ 米国(US) ㉕ 946415

⑳ 発 明 者 アレン, テレサ エム.

カナダ国 タイー 6 ジー 0 ビー 4 アルバート, 72 エヌ ディー  
アベニュー 11223

㉑ 発 明 者 ガビゾン, アルバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94132 サンフランシスコ フ  
ォント ブールバード 135㉒ 出 願 人 リボソーム テクノロジー, イ  
ンコーポレイテッドアメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 メンロ パーク, ハミ  
ルトン コート 1050

㉓ 代 理 人 弁理士 山本 秀策

㉔ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許), GB(広域  
特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

## 請求の範囲

1. 薬物を捕捉したリボソームを含有する組成物であって、  
次の特徴を有する組成物:(a) リボソームのサイズが主として約0.05~0.5 $\mu$ であり、

(b) 該リボソームは實質的に均一相の二重層を有し、該二重層は、主として飽和アシル鎖を有するスフィンゴミエリンおよび中性リン脂質でなる群から選択される膜強化性脂質を少なくとも約50モル%の割合で含有し、そして、

(c) 該二重層は、約5~20モル%の糖脂質を含有し、該糖脂質は、ガングリオシド G<sub>N1</sub>、飽和ホスファチジルイノシトールおよびガラクトセレブロシド硫酸エステルでなる群から選択される。

2. 組織分布比により特徴づけられる請求の範囲第1項に記載の組成物であって、

該組織分布比は、該組成物を被検体に静脈内投与した2時間後に測定したときに得られる、静脈投与したリボソームの血液内における存在量を、投与されたリボソームの肝臓および脾臓における存在量の合計で割った値により示され、

該組織分布比は、同様にして形成された他のリボソーム組成物により得られる組織分布比の合計よりも大きく、該他のリボソーム組成物のうちのひとつは、糖脂質以外の膜強化性脂質を少なくとも約50モル%の割合で含有し、他のものは、膜強化性脂質ではない糖脂質を5~20モル%の割合で含有する。

3. 前記糖脂質がガングリオシド G<sub>N1</sub>である請求の範囲第1項に記載の組成物。

4. 前記糖脂質がホスホ添加されたホスファチジルイノシトールである請求の範囲第1項に記載の組成物。

5. 前記リボソームが主として0.07~0.02 $\mu$ のサイズの範囲である請求の範囲第1項に記載の組成物。

6. 前記膜強化性脂質がスフィンゴミエリンを包含する脂質スフィンゴミエリンリボソームであり、そして該リボソームは、スフィンゴミエリンおよびホスファチジルコリンを2:1から4:1のモル比で含有する、請求の範囲第1項に記載の組成物。

7. 前記膜強化性脂質が主として飽和アシル鎖を有するホスファチジルコリンである、請求の範囲第1項に記載の組成物。

8. 薬物がその内部に捕捉され、そのサイズが主として約0.05~0.5 $\mu$ であるリボソームの懸濁液を静脈注射により投与する、薬物による治療法であって、次のようなりボソームの調製を包含し、血液中におけるリボソームの寿命が長い、方法:

(a) 實質的に均一相の二重層を有し、該二重層は、主として飽和アシル鎖を有するスフィンゴミエリンおよび中性リン脂質でなる群から選択される膜強化性脂質を少なくとも約50モル%の割合で含有し、そして、

(b) 該二重層は、約5~20モル%の糖脂質を含有し、該糖脂

質は、ガングリオシド  $\text{GH}_1$ 、飽和ホスファチジルイノシトールおよびガラクトセレブロシド硫酸エステルとなる群から選別される。

9. 前記リボソームを静脈注射することにより得られる組織分布比が、同様にして形成された他のリボソーム組成物により得られる組織分布比の合計よりも実質的に大きい、請求の範囲第8項に記載の方法であって、

該組織分布比は、該組成物を被検体に静脈内投与した2時間後に測定したときに得られる、血液中のリボソーム存在量を、投与されたリボソームの肝臓および脾臓における存在量の合計で割った値により示され、

該同様にして形成された他のリボソーム組成物のうちのひとは、糖脂質以外の膜強化性脂質を少なくとも約50モル%の割合で含有し、他のものは、膜強化性脂質ではない糖脂質を5~20モル%の割合で含有する。

10. 前記糖脂質がガングリオシド  $\text{GH}_1$ である請求の範囲第8項に記載の方法。

11. 前記糖脂質が水素添加されたホスファチジルイノシトールである請求の範囲第8項に記載の方法。

12. 前記リボソームがスフィンゴミエリンおよびホスファチジルコリンを2:1から4:1のモル比で含有する、請求の範囲第8項に記載の方法。

13. 前記膜強化性脂質が主として飽和アシル鎖を有するホスファチジルコリンである、請求の範囲第8項に記載の方法。

#### 明 細 書

##### 循環時間の長いリボソーム

##### 1. 産業上の利用分野

本発明はリボソーム治療組成物に関し、特に静脈内投与された場合に血液中における循環時間が長いリボソーム配合物に関する。

##### 2. 背景技術

- Allen, T.M. (1981) *Biochem. Biophys. Acta* **640**, 385397.
- Allen, T.M., および Everest, J. (1983) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **228**, 539-544.
- Altura, B.M. (1980) *Adv. Microcirc.* **9**, 252-294.
- Alving, C.R. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 342344.
- Amwell, G., および Morell, A.G. (1974) *Adv. Enzymology* **41**, 99-128.
- Czop, J.E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:3831.
- Durocher, J.P. (1975) *Blood* **45**:11.
- Ellens, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **674**, 10-18.
- Gregoriadis, G., および Ryan, B.E. (1972) *Eur. J. Biochem.* **24**, 485-491.
- Gregoriadis, G., および Voorn, B. (1974) *Eur. J. Biochem.* **41**, 179-185.
- Gregoriadis, G., および Senior, J. (1980) *FEBS Lett.*

14. 薬物による腫瘍の治療に用いられる請求の範囲第8項に記載の方法であって、腫瘍に供給された薬物量が、薬物投与24時間後に腫瘍/腫瘍重量により算出すると、遊離型薬物を投与したときよりも数倍高い、方法。

15. 前記リボソームに簡便される薬物がブレオマイシンである請求の範囲第14項に記載の方法。

16. 前記リボソームに簡便される薬物がドキソルビシンである請求の範囲第14項に記載の方法。

17. リボソーム表面に腫瘍特異的結合分子を付加することによりリボソームを腫瘍に対して選択化することを含む、請求の範囲第14項に記載の方法。

129. 43-46.

- Greenberg, J.P. (1979) *Blood* **53**:916.
- Hakomori, S. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 733-764.
- Huang, E.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:4030.
- Jonah, B.H. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* **401**, 336-348.
- Juliano, R.L., および Stamp, D. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**, 651-658.
- Karlsson, K.A. (1982) *Int. Biological Membranes*, vol. 4, D. Chapman (編) Academic Press, N.Y., pp. 1-74.
- Kimelberg, H.K. (1976) *Cancer Res.* **36**, 2949-2957.
- Lee, H.C. (1980) *J. Immunology* **125**:88 (1980).
- Lopez-Barastain, G. (1984) *Cancer Res.* **44**, 375-378.
- Okada, M. (1982) *Nature* **292**:261.
- Poznanek, M.J., および Juliano, R.L. (1984) *Pharmacol. Rev.* **36**, 277-336.
- Richardson, V.J. (1979) *Br. J. Cancer* **40**, 3543.
- Seba, T.H. (1970) *Arch. Intern. Med.* **128**, 1031-1052.
- Schever, R. (1982) *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.* **40**:131.
- Scherphof, T. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **542**, 296-307.
- Senior, J., および Gregoriadis, G. (1982) *FEBS Lett.*

145, 109-114.

28. Senior, J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 1-8.  
29. Szoka, F. Jr. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:4194.  
30. Szoka, F. Jr. (1980) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**:467.  
31. Woodruff, J.J. (1969) *J. Exp. Med.* **129**:551.

### 3. 発明の背景

リボソーム供給システムは様々な薬剤に対して提案されている。血液による薬剤供給に使用する場合、リボソームは、リボソーム内に捕獲された薬剤の調節された蓄積物放出を長期間にわたって与える可能性、および血液中における遊離薬剤の濃度を制限することにより薬剤の有害な副作用を低減する可能性を有する。リボソーム/薬剤組成物は、薬剤の用量を増大させ、薬剤投与の強度を減少させることにより、治療の便宜を増大させ得る。リボソーム薬剤供給システムは、Poznanek により、一般的な説明が与えられている。

肝臓内におけるリボソームによる薬剤供給に対して、長年にわたって提議されている1つの制限は、細胞内皮系(RES)とも呼ばれる単核食細胞系(MPS)により血液循環リボソームが急速に取込まれることである。循環しているマクロファージと、肝臓(クップファー細胞)、脾臓、肺、および骨髄の固定化マクロファージとから構成されるこの系は、リボソームを包含する外来の微粒子状物質を分単位の半減期で血液循環

増加することである。この利点は、血液中に薬剤を徐々に放出するという薬物速度論的な利点を増大させると共に、肝臓、脾臓、および肺を含まない組織を優先とする機会を増大させる。第2の利点は、RESのリボソーム負荷を減少させることである。外来粒子を除去する際におけるRESの役割に加えて、RESは、いくつかの他の機能を伴う。このような機能には、病原微生物、寄生虫、および腫瘍細胞に対する宿主防御；内毒素および出血性ショックに対する宿主応答；薬剤応答；および免疫複合体の循環に対する応答が含まれる(Saba, Altura)。従って、血液によるリボソーム投与においては、比較的短期の大量取込みまたは累積のリボソーム取込みにより、RESを著しく傷つけることを避けることが重要である。

提案されているあるアプローチは、血液中におけるリボソームの安定性を増大させることによりリボソームの循環時間を増大させることである。このアプローチは、本発明者の一人および他の研究者らによる研究に基づいているが、彼らは血液中におけるリボソーム内容物の漏出を減少させる因子が、RESによるリボソームの取込み速度をも減少させるということを示している(Allen, 1983; Gregoriadis, 1980; Allen, 1981; Senior, 1982)。このような効果に寄与する最も重要な因子は、二重層の硬さのようである。この因子は、血清成分、特に高密度リボタンパクの不安定化効果に対するより高い抵抗性をリボソームに付与する(Allen, 1981; Scherphof)。このように、リボソームの二重層内にコレステロールを含有

### 特表平1-502590(3)

量から除去する(Saba)。最も広範囲に研究された微粒子状の薬剤担体の1つであるリボソームは、肝臓のクップファー細胞により循環からまず除去され、そして他マクロファージ集団によりさらに少なくなるまで除去される。

RESがリボソーム取込みを行なう因子に関する様々な研究が報告されている。初期の実験では、主な脂質成分としてホスファチジルコリン(PC)およびコレステロール(CS)を含有する多重ラメラリボソーム(MLV)の不均一な調製物を使用し、これらのリボソームが、初期の急速な取込み段階に続き取込みが緩慢となる段階を有する2段階工程で、肝臓および脾臓へ取込まれることにより、循環から急速に除去されるということが示された(Gregoriadis, 1974; Joshi; Gregoriadis, 1972; Juliano)。循環からのMLV除去に対する半減期は、静脈内(IV)注射後5〜15分程度であった。負に荷電したリボソームは、中性または正に荷電したリボソームよりも急速に循環から除去される。小さな単ラメラリボソーム(SUV)は、MLVに比べて約3〜4倍長い半減期を有することが明らかになった(Juliano; Allen, 1983)。肝臓および脾臓によるリボソームの取込みは、マウス、ラット、サル、およびヒトを包含するいくつかの種において同様の速度で起こる(Gregoriadis, 1974; Joshi; Kinsberg, 1976; Juliano; Richardson; Lopez-Berestein)。

RESを回避し得るリボソームは、2つの重要な利点を有する。第1の利点は、血液中におけるリボソームの循環時間が

をさせることにより、RESによる取込み速度を低下させ得る(Gregoriadis, 1980; Huang; Patel, 1983; Senior, 1985)。そして、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)から構成されるリボソーム、あるいは多量のスフィンゴミエリン(SM)を含有するリボソームのような硬いリボソームは、肝臓への取込み速度および取込み量が減少することを示す(Allen, 1983; Ellison; Senior, 1982; Huang)。

しかしながら、このアプローチは、血液中におけるリボソームの循環時間を増大させる可能性に限界がある。本発明を支持するために実施された研究、および以下に示した研究によると、0.1〜0.2ミクロンのリボソームを含有する最速な脂強化リボソーム配合物は、静脈内リボソーム投与の2時間後は主としてRES中に局在している。長い循環時間は、小さな単ラメラ小胞または(約0.03ミクロンと0.08ミクロンとの間のサイズ範囲を有する)SUVにより達成されるが、SUVは一般に、薬剤運搬能力が小さく、かなり不安定であるため、薬剤供給には、あまり有効ではない。SUVは、リボソームに付随した薬剤の急速な放出をもたらす。大きく、不均一なサイズを有するリボソームを生じるリボソーム融合という現象を引き起こし得る。

本出願人を含め数人の研究者らは、赤血球の表面をまわってリボソーム表面を設計することにより、リボソームの循環時間を増大させる可能性についても探究した。細胞認識現象における細胞表面の糖質の役割は広く認識されている(Ashwell

Bakewell, Larsson)。シアル酸の化学、代謝、および生化学機能に関する説が報告されている(Schauer)。ガングリオシド、および糖タンパク(例えば、グリコホリン)により運搬されるシアル酸は、循環中における赤血球、血小板、およびリンパ球の生に大きな役割を果たしている。末梢にガラクトース受容体が発出しているシアル酸を酵素的に除去すると、循環から赤血球が急速に除去され、肝臓のクッファー細胞へ取込まれる(Derocher)。血小板(Greenberg)およびリンパ球(Woodruff)からのシアル酸除去は、やはり肝臓によるそれらの急速な除去をもたらす。

シアル酸が除去された赤血球は、血清不在下のインビトロでは、クッファー細胞または肝臓のマクロファージに結合するが、著しい貪食作用を起こさせるには血清を添加しなければならない。貪食作用を仲介する血清成分の本質は不確かであるが、免疫グロブリンおよび補体(C3b)が関与すると考えられる。Caopら(Caop)は、通常ヒトの単球による貪食作用を受けないヒツジの赤血球が、シアル酸を除去すると、C3bに結合し、そして貪食作用を受けるということを示している。Okadaら(Okada)は、リボソーム膜上のシアリ糖脂質が他の補体経路の活性化を制限すること、およびこれら糖脂質から末梢のシアル酸を除去すると、この制限能力が無効になり、他の補体経路の活性化を起こすということを示している。従って、シアル酸は、部分的にはC3bの結合を妨げる能力によって、細胞膜上の非糖脂質分子として機能し、他の補体経路に

よる貪食作用を妨げることができる。他の免疫因子もリボソーム貪食作用に関与し得る。Alvingに、個々のヒトから得た試験血清の50%が、リボソームに対する補体依存性免疫傷害を仲介する天然の「抗リボソーム」抗体を含有しているということを示している。

上記の結果は、例えばガングリオシドまたはグリコホリンの形でリボソーム中へ取込まれた表面シアル酸および/または他の赤血球表面物質が、リボソームの循環半減期を増大させ得るということを示唆している。このアプローチは、例えば米国特許第4,501,728号の「RES認識からのリボソームのマスクング」に述べられている。しかし、この特許は、リボソームをシアル酸で被覆することにより、有害のRESマスクングが実際に達成されるかどうかについて開示していない。

実際、本発明を支持するために実施された実験によると、シアル酸は、ガングリオシドの形で、ホスファチジルコリン(卵PC)、あるいは卵PC:コレステロール複合物のような、従来のリボソーム脂質から主として構成されるリボソームにおけるインビボでの循環半減期を延長する能力に制限がある。PC:コレステロール:ガングリオシドから構成されるリボソーム(0.2ミクロンまたはそれ以下)のインビボでの取込みに関する研究によると、注射されたリボソームは投与の2時間後には主としてRESに局在している。

要約すると、血液中におけるリボソームの循環時間を増大させるためのいくつかのアプローチが提案されている。しか

しながら、従来、これらのアプローチは、特に非糖脂質組成物に対して一般的に最も望ましい0.07~0.2ミクロンというサイズ範囲のリボソームの血液循環時間をごくわずかに向上させただけである。

#### 4. 発明の要旨

従って、著しく向上された血液循環時間を与える改良されたリボソーム組成物を提供することが、本発明のある一般的な目的である。

本発明のさらに特定の目的は、リボソーム投与の数時間後に、肝臓および脾臓よりもむしろ主として血液中にリボソームが局在するような組成物を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、約0.08ミクロンと0.2ミクロンとの間の選択されたサイズ範囲内にあるリボソームを含有する組成物を提供することである。

腫瘍治療における改良された薬剤供給および/または薬剤的活性化のために、血液中で薬剤を運搬するリボソームの寿命を著しく延長する方法を提供すること、本発明のさらに別の目的である。

本発明は、血液中における循環を増強するように設計されたリボソーム組成物を包含する。この組成物におけるリボソームは以下のように特徴づけられる:(a)リボソームのサイズが約0.07ミクロンと0.4ミクロンとの間の選択されたサイズ範囲内にある;(b)実質的に均一相のリボソーム二重層が少なくとも約50モル%の膜強化脂質から構成される;および(c)約

5モル%と20モル%との間の糖脂質成分が、ガングリオシドGB1、水酸化ホスファチジルイノシトール、およびスルファテド(すなわち、ラクトセレブロンドモノガラクトシルの硫酸エステル)からなる群から選択される。糖脂質の親油性部分は、層分離を起こすことなく、成分をリボソーム二重層中にとどめるように作用する。

リボソームは増強された組織分布を示す。組織分布は、リボソームの静脈内投与の2時間後、4時間後、および24時間後に測定する場合に、肝臓および脾臓におけるマーカの結合量に対する血液中に存在するリボソームマーカの比により測定される。好ましくは、血液/RES比は、投与の2時間後に測定した場合、少なくとも約50モル%の膜強化脂質を含有するが、糖脂質を含有せず同様に構成されたリボソーム組成物を用いて得られた一方の場合の血液/RES比と、5モル%と20モル%との間の糖脂質は含有するが、膜強化脂質を含有せず同様に構成されたリボソーム組成物を用いて得られた他方の場合の血液/RES比との合計より実質的に大きい。

ある好ましい実施形態では、膜強化脂質は、スフィンゴミエリンと中性リン脂質(例えば、ホスファチジルコリン(PC))との組合せである。好ましいモル比は、約2:1と4:1との間である。別の実施形態では、この脂質は飽和PCであり、コレステロールを有するものも、有さないものもある。

(以下空白)

## 発明の詳細な説明

本発明のリボソーム組成物は、栄養添加物、ビタミン、またはキレート化金属などの薬剤または他の薬品を、血液により被膜体に供するように、かつ RES によるリボソームの取込みが比較的徐々に行われるように設計されており、そのことにより薬剤または薬品が長時間またはそれ以上の長期間にわたってリボソームから血液中に放出される。あるいは、該組成物は、リボソームの表面を適当に改変することにより、薬的組織の隣接した領域において薬剤または薬品を濃縮させるために、血液による非 RES 薬的組織の標的化を行なうように設計されている。

以下の第1節Aでは、インビボでの RES によるリボソーム取込みを評価するのに使用される一般的な方法について述べられている。第1節Bでは、本発明のある局面に従って、静脈内注射されたリボソームに対して長い血液循環時間を与えることが見出されているリボソーム成分の組合せについて述べられている。第1節Cでは、静脈内投与を行なうように設計された薬剤含有リボソームの調製方法、サイズ調整方法、および殺菌方法について述べられている。薬剤供給および薬剤標的化におけるリボソーム組成物の有用性は第2節で考察されている。

## 1. リボソーム組成物の調製

## A. インビボでの RES によるリボソーム取込みの測定

インビボでのリボソーム循環時間を評価するに用いられる

る。これは、上述したように、肝臓および脾臓によるリボソームの取込みが、マウス、ラット、サル、およびヒトを含むいくつかの哺乳動物種では、同様の速度で起こることが見出されているからである (Gregoriadis, 1974; Jonah; Kinsler, 1976; Juliano; Richardson; Lopez-Bernestein)。この結果は、RES によるリボソーム取込みに最も重要であると思われる生化学的な因子 (血清リポタンパクによる最適化、サイズに依存する取込み効果、および表面部分による細胞保護を含む) は、調べた哺乳動物種のすべてに共通の特徴である。

## B. 脂質成分

本発明のリボソームを形成するのに用いられる脂質成分は、3つの重要な基準を満たすように選択される。

第1に、脂質の主成分、すなわち50モル%を上回る成分は、中性の膜強化成分であって、比較的強固であり、密に充填された脂質二重層の構造を生じる非荷電脂質成分を意味する。典型的には、該脂質は、主として相転移温度( $T_c$ )が約25℃以上、好ましくは約30℃と50℃との間にある飽和脂質である。好ましい膜強化脂質には、SN ( $T_c$ が約30℃)と、アシル値が主として飽和しているPCのような中性リン脂質が含まれる。ここで広範囲に研究されている飽和PCは、 $T_c$ が約50のジステアロイルPC(DSPC)である。

第2に、そして本発明の重要な特徴によれば、脂質成分は、リボソームの外側表面で部分的に保護されているような、すなわちある種の電荷-電荷結合相互作用が起こらないような

方法では、血液中および RES の主要器官における注射後の選択された時刻での静脈内注射されたリボソームの分布が測定される。使用される標化モデルでは、肝臓および脾臓、すなわち RES の主要器官における全リボソームに対する血液中の全リボソームの比により、RES 取込みが測定される。実際には、年齢および性別をそろえたマウスに、放射標識されたリボソーム組成物を、尾部の静脈に静脈内(IV)注射し、全血の放射標識カウントと、肝臓および脾臓を合わせた放射標識カウントとを測定することにより、各時刻におけるポイントを決する。多くの研究では、すべての体の部分の完全解剖、重量測定、および放射活性の測定が行われた。全血のカウントは、全血の容量が動物の体重の7%を構成すると仮定することにより計算される。実験方法については実施例2で詳細に述べられている。

RES によるリボソームの初期取込みのほぼ 100%が肝臓および脾臓で行われるため、上述した血液/RES 比は、インビボでの血液から RES への取込み程度の良い近似を与える。例えば、約1またはそれ以上の比は、血液中に残留している注射されたリボソームが支配的であることを示し、約1を下回る比は、RES 中のリボソームが支配的であることを示す。興味ある脂質組成物の大部分は、血液/RES 比を2時間後、4時間後、および24時間後に計算した。

モデルの動物系を用いて得られたデータは、ヒトおよび獣医が扱う興味ある動物についても正しく推定することができ

る。単一の負電荷を有する負に荷電した糖脂質を含有しなければならぬ。現在までに、リボソーム配合物を用いて達成された高い血液/RES 比から示されるように、このような特徴を有する3つの糖脂質が同定されている。これらは、ガングリオシド  $GM_1$ 、水酸化ホスファチジルイノシトール (HPI)、およびスルファチド (すなわち、ガラクトセレブロシドの硫酸エステル) である。これら3つの化合物は、第1図Aから第1図Cにそれぞれ示されており、ここで  $GM_1$  および硫酸エステル化合物の2番は長鎖炭化水素である。この図に示されている特定のスルファチドはセレブロン酸である。

第3に、上記の脂質成分は、実質的に均一相の二重層構造を生じなければならず、このことは、臨界面を強化し、かつ負に荷電した脂質成分が、物理的に分離した不連続相とは対照的に単一の相に存在することを意味する。明らかに、この要求は、このリボソームによって得られる血液/RES 値を増大させ、さらに血液中における急速なリボソームの循環および漏出を最小限に抑える。

選択された糖脂質の1つと組み合わせた膜強化脂質成分の重要性は、実施例3、4、8および9で示されている血液/RES のデータから評価し得る。実施例3の表1は、いくつかのリボソーム組成物と、注射の2時間後に測定された対応する血液/RES 値とを示している。表中の組成物3および4を比較すると、卵PCおよび  $GM_1$  を含有するリボソームにコレステロールを添加することにより得られる血液/RES 値が大きく上昇す

ることがわかる。コレステロールは、7cが約0であるような比較的流動性を有する脂質(例えば、卵PC)に対する強化効果または「パッキング」効果を有することが知られている。さらに重要なことに、本発明の目的に対し、組成物3および4と、組成物12および13とを比較すると、SHと組み合わせたGH<sub>1</sub>は、PCと組み合わせたガングリオシドよりもはるかに高い血液/RES値を与える。ここでは、組成物17および18に関して、コレステロールがSH:GH<sub>1</sub>の配合物における血液/RES比を減少させることが注目される。これは、おそらくいくつかの強化脂質組成物においてよく知られたコレステロールの流動化効果によるものである。

表1のいくつかの配合物における卵PCに替えてDSPC(すなわち、飽和脂質PC)を用いた場合の効果は実施例4の表2から明らかである。DSPCおよびGH<sub>1</sub>は共に、明らかに血液/RES値を効果的に増大させている。この効果は、該組成物にSHを追加することにより、さらに増強され、この比はSH:PCの相対量が最高である場合に最高となる。DSPCの存在下では、血液/RES比から明らかのように、コレステロールの流動化効果は小さいようである。

BPIを用いて得られる血液/RES値に対する飽和脂質の効果は表5および表6から明らかである。これらの表では、PC:CH中にPI(不飽和P)を含有する組成物と、不飽和PC(DOPC):CH中にBPIを含有する組成物とが、BPI: DSPC: CHを含有する組成物と比較されている。飽和組成物の血液/RES比は、不

飽和組成物(不飽和PIまたは不飽和PCのいずれか)の血液/RES比よりも実質的に大きい。24時間後の全固収量がより大きいことから明らかのように、飽和組成物に不飽和PIまたは不飽和PCを含有する2つの組成物よりも血液中で安定である。飽和PI、例えばBPIに対する要求は、強化脂質の二重層構造におけるPI成分の相分離を防止することである。

リボソームを含有するスルファチドの血液/RES比に対する飽和脂質の効果は、表6の血液/RESのデータを比較することにより評価することができる。この表から明らかのように、SULPを飽和脂質成分と組み合わせる用いた場合、24時間後の血液/RES比は約15倍に増加している。ここで定義されるように、スルファチドはイオス(Ios)を包含する。

実施例8は、いくつかのリボソーム組成物について注射の4時間後における血液/RES比を調べたものである。この結果は、注射の2時間後に見られる上記の結果と一致している: DSPCおよびCHと組み合わせる場合には、SHの存在下または非存在下で、GH<sub>1</sub>を含有するリボソームは、卵PCとCHとを含有するリボソームに比べて、はるかに高い血液/RES値を与える。ここでのデータはまた、飽和リン脂質(DSPC)およびコレステロールの存在下では、BPIも高い血液/RES値を与えることを示している。

実施例9の表6は、注射の24時間後に測定した数多くのリボソーム組成物に対する血液/RES値を示している。これらの組成物は、血液/RES値が増加する順に配列されている。まず、

血液/RES値は4時間と24時間との間では著しく減少しているが、最良の配合物では24時間後でも比較的良好的な血液/RES値(例えば、0.3またはそれ以上)を示すことが明らかである。これらの配合物には、SHの存在下または非存在下で、飽和PC(DSPC)およびコレステロールと組み合わせるSULP、BPI、およびGH<sub>1</sub>が含まれる。

ここで、リボソームの脂質成分を考慮すると、上で考察したデータ、および特に表8の比較データは、GH<sub>1</sub>、BPI、およびSULPが、脂質成分と組み合わせると高い血液/RES比を生じるのにすべて効果的であることを示している。本発明を支持するために実施された研究においては、これら3つの脂質と、それらの血液/RES比への効果とを、他の様々な関連する脂質またはリン脂質と比較している。

実施例7の表3は、様々な異なる脂質および負に荷電したリン脂質のうちの1つを包含するPC:CHおよびSH:PC組成物に対する血液/RES値を示す。脂質の寄与および関連する構造的特徴は実施例7で詳細に述べられている。いくつかの調べた脂質成分のうち、GH<sub>1</sub>のみ、あるいはGALまたはGLUと組み合わせるGH<sub>1</sub>が、PC:CHリボソームにおいて高い血液/RES値を与えた。SH:PCリボソームでは、SULPが比較的高い血液/RES値を与えた。

実施例7で詳細に述べられているように、いくつかの異なるガングリオシドのうちの1つを含有するSH:PCリボソームの血液/RES値もまた調べた。表4から明らかのように、GH<sub>1</sub>

から1個またはそれ以上の末端糖基を除去すること(GH<sub>2</sub>およびGH<sub>3</sub>)、GH<sub>1</sub>からシアル酸糖基を除去すること(ASGH<sub>1</sub>)、あるいは1個より多くのシアル酸糖基が存在すること(GD<sub>1</sub>、またはGT<sub>1</sub>)は、GH<sub>1</sub>の血液/RES増強効果を実質的に解消する。

表5では、PC:CHリボソーム中におけるGH<sub>1</sub>、SULP、およびBPIは、すべて同程度の血液/RES値(約1)を与えるのに対し、強化脂質成分を用いた場合にはGH<sub>1</sub>およびBPI(すなわちSULPは試験しなかった)が最も高い値を与えることがわかる。これら3つの成分は、上述したように、飽和脂質配合物中で最も高い血液/RES値を与えた。

第2図Aおよび第2図Bは、2つの異なるリボソーム配合物中におけるGH<sub>1</sub>のモル比の関数として、血液/RES値をプロットしたものである。第2図Aに示されている第1の配合物は(最速以下の血液/RES比を与える)PC:CH配合物であり、第2の配合物はSH:PC配合物である。実施例6で考察されているように、後者の配合物のみが強いGH<sub>1</sub>効果を示す。これから明らかのように、GH<sub>1</sub>の最適な濃度は、5モル%と15モル%との間である。血液/RES比に対する高い脂質濃度の効果は実施例10で明らかになる。実施例10では、DSPC:CHまたはPC:CHを含有し、かつBPIのモル濃度が増加するリボソームに対する4時間後および24時間後の血液/RES比について調べられている。約25%を超えるBPIのモル比では、約15モル%またはそれ以下の濃度において見られた高い血液/RES値が実質的に解消された。

上で考察した 果は、膜強化成分と組み合わせることにより、血液/RES値を上昇させるのに最も効果的な糖脂質が2つの特徴を共有していることを示唆している。第1 特徴は、GH<sub>1</sub>におけるシアル酸、BPIにおけるリン酸極性基、あるいは硫酸エステルにおける末端ガラクトシル基に関連していると思われる単一の負電荷である。この荷電した基の考えられる1つの役割は、インビトロまたはインビボのいずれかにおけるリボソームの凝集を低減させることである。CIFJ、DGDG、MGDG、GAL、GLOB、ASGM<sub>1</sub>、または GLUを包含する非荷電の糖脂質にいずれも、および2または3個の電荷を有する糖脂質のいずれもが高い血液/RES比を与えなかった。

第2の必要な特徴は、糖脂質の荷電した基との直接的なタンパク相互作用および/またはカルシウムイオン相互作用を妨げ得る電荷保護である。GH<sub>1</sub>の場合、荷電したシアル基が2つの末端糖基により、保護され得る(第4図Aを参照)。興味深いことに、保護し得る糖基を1つ有する GH<sub>1</sub>は血液/RES値を上昇せず、このことは両方の糖基が必要であることを示唆している。BPIでは、負に荷電したリン酸基が末端のイノシトール残基により保護される。このことは、荷電したリン酸基が露出していると思われるPA、および荷電したリン酸基が比較的小さなグリセロール残基により保護されているPSとは対照である。ここで、いくらかの電荷保護がなされているPGが BPIとPAとの中間の血液/RES値を与えることは注目される。スルファチド糖脂質の場合、比較的高い血液/

RES 値は、ガラクトシル残基(第4図C)上 負に荷電した硫酸基がリボソーム表面に部分的に埋められるか、あるいは保護されていることを示している。対照的に、硫酸基が露出していると思われる硫酸コレステロールは低い血液/RES値を与える。電荷保護が明らかに必要であるということは、2個の電荷を有する糖脂質および3個の電荷を有する糖脂質(例えば、GD<sub>1a</sub>およびGT<sub>1a</sub>)が、少なくとも1個の電荷が保護されていないと考えられるために、比較的小さな血液/RES比しか示さないのはどうしてかということも説明し得る。

脂質成分が均一相の二重層を形成する必要性は、部分的には、24時間またはそれ以上の期間にわたって血液中でリボソームが良好な安定性を示すのを確実にするのが目的である。リボソームの不安定性はRES の取込みを増大させられるので、二重層における相の均一性は、向上された血液/RES値に寄与するはずである。このことは、例えば、どうしてSH<sub>1</sub>GH<sub>1</sub>配合物が24時間後には比較的低い血液/RES比を与えるのに(表6)、2時間後には非常に高い比を与える(表1)のかということの説明し得る。両方の表のデータは、実施例9で詳細に述べるように、この配合物が血液中では非常に不安定であること、および/または漏出しやすいことを示している。

相の不均一性は、また、BSPC:CI混合物と組合わせた場合には、BPI に比べてPIの方が血液/RES比を増大させるのに効果がないのはどうしてかを説明し得る。何故なら、BPI が糖

和PCとのより良好な相適合性を有する(より類似した1cを有する)と思われるからである。

リボソーム組成物に必要とされる膜強化剤およびガングリオシドに加えて、リボソームのRES 阻害特性を著しく傷つけない他の中性の小胞形成脂質を含むようにリボソームを配合し得る。明らかな例としては、上述の配合物の多くに使用される、約30%のモル比のコレステロールがある。

リボソームはまた、リボソームに対する、および/またはリボソーム中に捕捉されて運搬される薬剤に対する酸化的損傷を最小限に抑えるために、エートコフェロールまたは他の遊離基阻害剤のような保護剤を含有し得る。

#### C. リボソーム組成物の調製

リボソームは、Szokaら(1980)により詳述されているような様々な技術によって調製され得る。薬剤含有リボソームのある好ましい調製方法は、Szokaらおよび米国特許第4,235,871号により述べられている逆相蒸発法である。この方法では、リボソーム形成脂質溶液を少量の水性媒体と混合し、この混合液を分散させて油中水型エマルジョンを形成させる。供給されるべき薬剤または他の製剤剤は、親油性薬剤の場合には脂質溶液に添加され、水溶性薬剤の場合には水性媒体に添加される。ここで、すべての脂質および水性成分は、好ましくは無菌であり、発熱因子を全く含まないべきであることに注意する。蒸発により、脂質溶液を除去した後、得られたゲルは、水溶性薬剤に対しては50%までのカプセル化効率で、リ

ボソームに変換される。逆相蒸発小胞(REV)は約2~4ミクロンの典型的な平均サイズを有し、そして主としてオリゴラメラである。すなわち1個または2、3個の脂質二重層殻を含む。この方法は実施例14で詳細に述べられている。

REVは、以下に考察されているように、好ましくは約0.08~0.4ミクロンの間の最大の選択されたサイズを有するオリゴラメラ小胞を与える押し出しにより、容易にサイズ調整することができる。本発明を支持するために実施例された実験によると、この型のサイズ調整されたオリゴラメラ小胞は、同様にサイズ調整された多重ラメラ小胞(MLV)に比べて実質的に高い血液/RES比を示し、例えば0.16~0.17ミクロンのサイズを有するより小さな REVは、例えば0.4ミクロンのより大きなREVに比べて高い比を与える。REVの別の利点は、脂質に対するカプセル化薬剤の割合が高いことであり、このことにより、所定の脂質量でより多くの薬剤用量を投与し得る。

必要に応じて、MLV は簡単な脂質膜水和技術により形成し得る。この方法では、通常の媒体に溶解した、上で詳述した型のリボソーム形成脂質の混合液を容器中で蒸発させて薄膜を形成し、次いで水性媒体に接触する。この脂質膜は水和して、典型的には約0.1~10ミクロンの間のサイズを有するMLVを形成する。これらの小胞は、サイズ調整されていない場合には、表9から明かなように、押し出さなかったMLV組成物に対する比較的小さな血液/RES比を示す。典型的には、MLVは、0.5ミクロンまたはそれ以下の所望サイズ範囲内に、好

ましくは下で詳述するように、押し出しにより、約0.07と0.12ミクロンとの間にサイズ調整される。

REVおよびHLVのある効果的なサイズ調整方法は、選択された均一な孔サイズ(典型的には、0.05、0.08、0.1、0.2、または0.4ミクロン)を有するポリカーボネート膜を通してリボソームの水性懸濁液を押し出すことを包含する(Szoka)。膜の孔サイズは、この膜を通して押し出すことにより作製されるリボソームの最大サイズにほぼ対応しており、特に調整物は同じ膜を2回またはそれ以上押し出される。リボソームのサイズを調整する方法は、以下の実施例で述べられている均一なサイズを有するREVおよびHLV組成物を調整するのに用いられる。より最近の方法は、非対称なセラミックフィルターを通して押し出すことを包含する。この方法は、米国特許出願第829,710号の「リボソーム押出方法」(1986年2月13日出願)に詳述されている。

あるいは、REVまたはHLV調整物は、0.04~0.08ミクロンの範囲のサイズにより特徴づけられる小さな単ラメラ小腫(SUV)を作製するように処理され得る。しかしながら、上で示したように、SUVは、水溶性薬剤を供給するには内容量が比較的小さく、また、融合することにより、不均一分散した薬剤の漏出特性と、RES取込み特性とを有するより大きな不均一サイズのリボソームを形成する傾向があり、REVまたはHLVに比べて漏出しやすい。SUVは、実施例1Cに述べられているように、REVまたはHLVを均質化したり、超音波処理する

ことにより、容易に作製することができる。

最終的なサイズ調整の後、リボソームに必要な応じて、フリーの(捕捉されていない)薬剤を除去する処理を行い得る。従来の分離技術(例えば、遠心分離、透析濾過、および分子ふるいクロマトグラフィー)が好適である。組成物は、一般的に用いられている0.45ミクロンの深さ フィルターを通して濾過することにより、液面することができる。

(以下空白)

## II. 用途

上記のようにして調整し、循環半減期を有意に増大させたリボソームは、治療または診断用の2種の一般的なタイプのリボソーム組成物に利用され得る。第1の組成物は、リボソームを循環させることによって、リボソームと結合させた薬剤の血液中への放出を持続させるよう設計されている。上記から明らかなように、本発明によって調整されたリボソームは、大部分が24時間まで血液中に保持されるので、約1日間あるいはそれ以上まで、生理学的に有効なレベルで薬剤の放出が持続され得る。

血液中での薬剤の利用性が増大したことを示すひとつの尺度としては、血液/RESリボソームが高い場合に認められる曲線下領域(AUC)の増大がある。AUCの測定は、実施例9に記載したように、血液および肝臓の両方について、24時間にわたリリボソームマーカのレベルを測定することにより行われる。これらのAUC値の比率により、総リボソーム利用率の度合が肝臓から血液へ移ったことが示される。実施例7の表7は、高い血液/RES値が、高いAUC比率と相関関係のあることを示す。

血液中のリボソームの寿命が延長したので、注射されたリボソームの有意な量が、RESによって血液から除去される前に標的部位に到達できるように。特に、腫瘍患者に静脈投与することにより、腫瘍組織を標的として薬剤治療を行なうことが望ましい。

動物の腫瘍を標的とする本発明のリボソーム組成物の使用は、実施例11~13に詳細に記載される。結果を要約すると、血液/RES比が増大したときのリボソームは、腫瘍の運動に比べて腫瘍への取込みが10~30倍増大する。腫瘍中に高濃度の薬剤が認められるのは、投与後4~48時間であるが、腫瘍への取込みは投与後24時間がピークであった。処置方法の詳細は実施例に示す。

種々の薬剤または他の薬理学的に活性な試薬が、リボソーム組成物による供給に連している。薬剤の一般的なクラスのひとつには、水溶性でリボソーム透過性の化合物が含まれる。このような化合物は、リボソーム懸濁液の水性部分に優先的に分配され、時間の経過とともに、細胞膜においてリボソームの内部空間と外側のバルク相の間に平衡化する傾向にあることにより特徴づけられる。このクラスの代表的な薬剤としては、ナルブタリン、アルブテロール、硝酸アトロピンメチル、クロモリナトリウム、プロプラノロール、フルノイソリド、イブプロフィン、ゲンタマイシン、トベルマイシン、ペンタアミグン、ペニシリン、テオフィリン、プレオマイシン、エトキシド、キャプトブレール、ローアセチルシステイン、ベラパミル、ビタミン類、およびキレート化金属のような放射線不透過性で粒子放出性の物質が含まれる。これらの薬剤は、媒体の水性組成物と平衡化する傾向があるため、リボソーム組成物は凍結乾燥した状態で貯蔵し、投与直前に再水和するのが好ましい。あるいは、この組成物を凍結形態



で製造し、投与前に 賦してもよい。後者 方法は、1986年 5月7日出願の米国 特出願第860,528号「リボソーム濃縮物およびその方法」に詳細に記載されている。

薬物の第2のクラスは、水溶性ではあるが、リボソーム不透過性の薬物である。大部分は、これらは、ペプチドホルモン、酵素、酵素阻害剤、アポリポタンパクのようなペプチドまたはタンパク分子であり、そして、高分子量の炭水化物はカプセル化ときに長期間安定であるという特徴を有する。このクラスの代表的な化合物としては、次の化合物が含まれる：カルシトニン、アトリオペプチン、<sup>99</sup>Tc-アンチトリプシン（プロテアーゼ阻害剤）、インターフェロン、オキシトシン、バソプレッシン、インスリン、インターロイキン-2、スーパーオキシドジムスターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター(TPA)、血漿因子8、上皮成長因子、腫瘍壊死因子、肺界面活性タンパク、インターフェロン、リボコルチン、<sup>99</sup>Tc-インターフェロンおよびエリスロポエチン。

第3のクラスの薬物は、親油性分子であり、この親油性分子は、脂質二重層の相に分配されやすく、そのため、主として膜に捕獲された形態でリボソームと会合している。このクラスの薬物は、1よりも大きく、好ましくは約5より大きいオイル/水分配係数で規定される。この係数はオクタノール/水のような標準オイル/水混合物中で測定される。このクラスの代表的な薬物としては、次の化合物が含まれる：プロスタグランジン類、アンホテリシンB、プロゲステロン、

イソソルビドジナイレート、テストステロン、ニトログリセリン、エストラジオール、ドキソルビシン、ベクロメタゾンおよびそのエステル類、ビタミンE、コルチゾン、デキサメタゾンおよびそのエステル類、およびベタメタゾンバレレート。

血液を介して薬物放出を持続させるために、リボソーム組成物は、望まれる分配時間、典型的には12~24時間にわたり適切な薬物量を与える量で静脈投与される。この注射は、一度に行なうかまたは徐々に静脈点滴で行われ得、リボソームが注射部位から徐々に分散される。

選択された非 RES組織部位をリボソームの標的とした場合には、リボソームは、好適には標的部位的分子の表面を認識するように設計される。例えば、固相腫瘍を標的とする場合には、表面に結合した腫瘍認識分子（例えば、腫瘍特異的抗原に対する抗体）とともに調製され得る。このタイプの分子を結合させる方法は、当業者に公知である。このような方法は、ホスファチジルエタノールアミンのような脂質成分をリボソームに組み込む方法を一環に包含し、これらの脂質成分は活性化されて、表面物質または脂質膜酸化プレオマイシンのような誘導された親油性化合物と結合し得る。

固相腫瘍部分を放射線造形するのに有用な特定のリボソーム組成物においては、リボソームは、カプセル化された放射線不透過性の、または粒子放出性の金属で、典型的にはキレート化された形で調製され、リボソームが腫瘍部位に優先的

に結合するように、表面に結合したプレオマイシン分子を有する。上記キレート化された形は、リボソーム二重相を介して金属が透過するのを實質的に阻止する。

次の実施例は、循環時間を長くしたりリボソームの調製方法およびインビボおよびインビトロにおける循環時間を近づける方法を示す。実施例は、本発明の特定のリボソーム組成物と方法を例示するのを目的とするが、本発明を限定するものではない。

セラミド類(CE)、コレステロール(CH)、モノガラクトシルステレート スルファチド類(SULF)、ガラクトセレブロシド類(GAL)、グルコセレブロシド類(GLU)、およびラクトシルセラミド(LAC)は、シグマ社(Sigma; St. Louis, MO)から入手した。スフィンゴミエリン(SM)、ホスファチジルコリン(レシチン)(PC)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルイノシトール(BPI)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルグリセリロール(PG)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ジバシトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジバシトイルPC(DPPC)、ジオレイルPC(DOPC)およびジステアロイル(DSPC)は、アベンティ ボーラー リピッド社(Aventi Polar Lipids; Birmingham, AL)から入手した。グロボシド類(GLOB)、ジガラクトシルジグリセリド(DGDG)、モノシアログングリオシド(GH<sub>1</sub>)、ガングリオシドFEN<sub>2</sub>(GH<sub>2</sub>)、ガングリオシドGH<sub>2</sub>(GH<sub>2</sub>)、トリシアログングリオシド(GT<sub>3</sub>)およびジシアログングリ

オシド(GD<sub>3</sub>)は、スベルコ社(Supelco; Bellefonte, PA)から入手した。

[<sup>147</sup>Sm]-チラミニルイヌリンは、文献記載の方法で調製した。<sup>147</sup>Sm-チラミニルイヌリンは、NEHネオスカン社(NEH Neoscan; Boston, MA)より得た。ドキソルビシン(アドリアマイシン)はアドリア社(Adria; Columbus, OH)から、そして、プレオマイシンはブリストルマイヤーズ社(Bristol Myers; Syracuse, NY)からそれぞれ得た。

#### 実施例1

##### REV、NLV およびSUV の調製

この実施例では、逆相蒸発小胞(reverse phase evaporation vesicles: REV)、多室ラメラ小胞(multilamellar vesicles: NLV)および小室ラメラ小胞(small unilamellar vesicles: SUVs)の調製法について述べる。

##### A. サイズ調整されたREV

選択した脂質成分の全量50mg（モル比は下記実施例に示す）を、5 mlのジエチルエーテルに溶解させた。13mM 塩化、140 mM NaCl を含有するpH7.4の水性緩衝液を、有機溶液に、最終容量が6.5 mlとなるように添加した。次いで得られた混合物を、1分間超音波処理して乳化し、得られた溶液を室温またはそれを下まわる温度に保持した。リボソームが、カプセル化された [<sup>147</sup>Sm]-チラミニルイヌリンを含有するように調製される場合には、それは、約4 μCi/ml緩衝液、の濃度で上記リン酸緩衝液に含有される。

このエーテル溶液を、減圧下室温で除去し、得られたゲルを、上記緩衝液の1で取出し激しく攪拌した。得られたREV懸濁液には、顕微鏡で測定したところ、約0.1~20 $\mu$ mの粒子が含まれていた。主として比較的大きな(1 $\mu$ mより大きい)小胞で構成され、これら小胞は、1つもしくはごく少数の二重膜ラメラを帯びていた。

リボソームを、0.4 $\mu$ mもしくは0.2 $\mu$ mの選択された孔サイズを有するポリカーボネートフィルター(Saoka, 1978)を通して押出した。0.4 $\mu$ mのフィルターを通して押出されたリボソームは、平均0.17(0.05) $\mu$ mの直径であり、0.2 $\mu$ mのフィルターによるものは、平均0.15(0.05) $\mu$ mの直径であった。押出されたリボソームを、セファデックスG-50(ファルマシア社)を通過させて、カプセル化されていない(1991)チラニニルイヌリンを除去した。

#### B. RLV

選択した脂質成分の全量10~100 $\mu$ molを、クロロホルム:メタノール(2:1)に溶解させた。溶解させた脂質溶液を回転エバポレーターで蒸発させて薄いフィルムとし、次いでカプセル化されるべき脂質(例えば、デスフェラルまたはプレオマイシン)を含有する水性生理学的緩衝液で水和した。1~2時間おだやかに攪拌してRLVを形成した。カプセル化されなかった脂質をゲル濾過法で除去した。このRLVを調べたところ、約0.1~20 $\mu$ mの不揃いなサイズを示し、大部分が多層膜構造であった。このRLVを、選択された大きさの細孔

を有する二重ポリカーボネート膜を通して押出してサイズ調整を行なった。膜の細孔の大きさは、低い相転移点(液体)のリボソーム配合物用のものについては典型的には0.05 $\mu$ mであり、高い相転移点(固体)のリボソーム配合物用のものについては0.08 $\mu$ mであった。いずれの場合についても、リボソームの寸法は、レーザー光線散乱法で測定すると、主として0.07~0.12 $\mu$ mの大きさの範囲内であった。高い相転移点の脂質が使用された場合には、再水和および押出しを50~60℃で行った。

#### C. SUV

上記のようにして得た大きさのそろっていないRLVの懸濁液約25mlに、1/2インチのサファイアを結合プローブを用いて超音波を照射し、最適の出力条件下で、15分間隔のバルス超音波処理を行なった。この超音波処理は、真空気流中でリボソームの容器を水中につけて行なった。超音波処理された小胞は、セファデックスG-50を通過させ、放出された遊離のマーカを除去した。リボソームのサイズは、主として0.03~0.08 $\mu$ mの範囲であった。

#### 実施例2

##### 血液/RES レベルの測定

年齢と性別とを揃えた、典型的にはその体重が20~25gのマウスの尾の静脈に、リボソーム懸濁液または生理食塩水を注射した。注射した物質の総量は、純注射容量0.2ml中にリン脂質が0.5 $\mu$ molであった。注射後、選択した時間間隔で、頭

部解剖によって動物を殺し、血液試料を心臓から採取し、肝臓と脾臓とを取出した。肝臓および脾臓の水分をめぐり取り、重量を測定し、直接、ガンマ線のシンチレーションカウンターでそれぞれ測定を行なった。血液が肝臓および脾臓に残留しているのを考慮して補正係数を用いた。血液試料の一部について同様に、直接、ガンマ線計数を行なった。全血液のカウントを、全血液容量が体重の7%であることに基いて算出した。血液RES比を、全血液カウント値/肝臓および脾臓の総カウント値として算出し、いくつかの他の組織についてもしばしば血液/RES比を決定した。

時間経過後に測定した血液/RES値は、リボソームの放射線損傷の損失について補正を行なった。この補正は、注射直後に測定したリボソームのカウント数をもとにして、各時点でインビボに残留している総カウント数のパーセントを、測定された血液/RES比にかけることにより行なわれた。

#### 実施例3

##### 脂質組成物と血液/RES比との関係

0.17 $\mu$ mの大きさにサイズ調整され、表1の左側に示すリボソーム組成とモル比とを有するREVを、実施例1と同様にして調製した。報告された研究に用いられたSHは、ウシ脳スフィンゴミエリンであり、その炭化水素鎖部分には、部分的に不飽和鎖が混合して含有する。リボソームを脾臓注射し、注射された動物を注射してから2時間後に殺した。表に、リボソームのサイズ、血液/RES比(前記のようにして算出)、

および注射して2時間後に回収されたカプセル化されたマーカ(イヌリン)の総量の全体に対する百分率を示す。

表1

組成	サイズ ( $\mu$ m)	血液/RES	イヌリン 回収率(%)
1 PC	0.17	0.010 $\pm$ 0.005	88.0 $\pm$ 5.4
2 PC:CH, 2:1	0.17	0.13 $\pm$ 0.08	78.1 $\pm$ 0.04
3 PC:SH, 1:0.07	0.17	0.17 $\pm$ 0.12	79.4 $\pm$ 5.9
4 PC:CH:SH, 2:1:0.14	0.16	1.7 $\pm$ 0.5	75.6 $\pm$ 5.7
5 PC:CH:ASGH, 2:1:0.14	0.16	0.52 $\pm$ 0.44	64.8 $\pm$ 1.8
6 DSPC	0.17	0.015 $\pm$ 0.002	91.2 $\pm$ 2.00
7 DSPC:CH, 2:1	0.17	0.007 $\pm$ 0.00	101.2 $\pm$ 2.4
8 DSPC:GH, 1:0.07	0.17	2.0 $\pm$ 0.02	76.7 $\pm$ 3.1
9 DSPC:CH:SH, 2:1:0.14	0.17	3.2 $\pm$ 1.0	64.6 $\pm$ 3.6
10 SH	0.17	0.02 $\pm$ 0.01	27.1 $\pm$ 3.1
11 SH:CH, 2:1	0.17	0.7 $\pm$ 0.2	71.9 $\pm$ 4.4
12 SH:GH, 1:0.07	0.17	5.7 $\pm$ 1.8	12.4 $\pm$ 0.7
13 SH:CH:GH, 2:1:0.14	0.17	4.6 $\pm$ 0.6	72.1 $\pm$ 1.6
14 SH:PC, 4:1	0.17	0.6 $\pm$ 0.2	69.0 $\pm$ 3.3
15 SH:PC:CH, 4:1:3	0.17	0.12 $\pm$ 0.06	69.9 $\pm$ 2.2
16 SH:PC:CH:SDLP, 4:1:3:0.35	0.17	0.43 $\pm$ 0.21	78.4 $\pm$ 1.4
17 SH:PC:SH, 4:1:0.35	0.16	3.3 $\pm$ 0.3	61.8 $\pm$ 2.9
18 SH:PC:CH:GH, 4:1:3:0.35	0.16	1.5 $\pm$ 0.5	88.5 $\pm$ 8.0
19 SH:PC:ASGH, 4:1:0.35	0.16	0.9 $\pm$ 0.5	80.3 $\pm$ 2.5

上記血液/RES比のデータは次の事項を示している:

L コレステロール(組成物4)、DSPC(組成物8)、およびSH(組成物12, 17)またはこれらの脂質成分の組み合わせ(組成物9および18)のような膜を強化する成分を含む。その内部にガングリオシドGH、を含有するリボソームは、GH、なしで膜を強化する成分を含有するリボソーム(組成物6, 7, 10, 11, 14または15)またはGH、を含有するが、膜を強化する成分を含有しないリボソーム(組成物3)に比べて、はるかに高い血液/RES比を与えた。

2 リボソーム中のGN<sub>1</sub>の代わりにアシラオガングリオシド (ASGN<sub>1</sub>) を用いると (組成物19対組成物17)、血液/RES比に対するGN<sub>1</sub>の増強効果を大きく減少させた。

総回収率 (%) のデータは、2種のSH配合物 (組成物10および12) では体内で 持続性に比較劣ることを示しており、これは、おそらくリボソームの安定性が低く、遊離したカプセル化マーカーが速やかに除去されるからであろう。

(以下余白)

#### 実施例4

##### DSPCの血液/RES比に対する影響

表2の左に示す5種の脂質組成物を有し、サイズ調整されたREVを上記と同様にして調整した。これらの組成物は、ジステアロイルPC (DSPC) を、比較的不飽和度の高い卵PC (PC) の代わりに用いたこと以外は、表1の組成物のいくつかと類似している。血液/RES比を、実施例3と同様にして静脈注射してから2時間後に測定し、結果を表2の右例に示した。表1および表2における同様の組成物の血液/RES値を比較すると、次の事柄がわかった：

1. SH:PC:GN<sub>1</sub>組成物中のPCの代わりにDSPCを用いる (表2の組成物2対表1の組成物17) と、血液/RES比が有意に増大する。

2. SH:PC:CB:GN<sub>1</sub>組成物中のPCの代わりにDSPCを用いる (表2の組成物5対表1の組成物18) と、同じく、血液/RES比が増大する。

表2

リボソーム組成	血液/RES比
DSPC:GN <sub>1</sub> , 5:0.35	1.8
SH:DSPC:GN <sub>1</sub> , 4:1:0.35	4.9
SH:DSPC:GN <sub>1</sub> , 1:1:0.14	3.7
SH:DSPC:GN <sub>1</sub> , 1:4:0.35	3.1
SH:DSPC:CB:GN <sub>1</sub> , 4:1:3:0.35	1.7

#### 実施例5

##### 24時間にわたる血液/RES比の時間経過

##### 2種のリボソーム組成物の血液/RES比

(1) PC:CB:GN<sub>1</sub>, 2:1:0.14 (組成物4) および (2) SH:PC:GN<sub>1</sub>, 4:1:0.35 (組成物17) を含有し、サイズ調整した (0.17 μm) REVを有する2種のリボソーム組成物の血液/RES比を、注射2、6および24時間後に測定した。この2種の配合物の24時間にわたる挙動を、第1図に示す。第1図において黒丸は組成物4、白丸は組成物17を示す。

図から明らかなように、組成物1は、注射2時間後に完全に除去される。これに対して、組成物2は、注射24時間後においても有意のレベルを保持している。

#### 実施例6

##### 血液/RES比に対するガングリオシド濃度の影響

カプセル化されたイヌリンを含有し、サイズ調整されたREV (0.17 μm) を、上記と同様にして調整した。リボソーム組成物は、PC:CB, 2:1を含有し (第2図A)、あるいはSH:PC, 4:1を含有していた (第2図B)。前者におけるGN<sub>1</sub>は、0, 2.5, 5.0, 7.5および10モル%であり、後者におけるGN<sub>1</sub>は前者と同様であり、さらに12および15モル%のものを包含する。組織に分配されたリボソームの量を、肝臓 (三角印)、脾臓 (四角印) および血液 (丸印) について、静脈投与2時間後に、前記したのと同様にして測定した。

第2図Aを参照すると、GN<sub>1</sub>のモル量を増加させると、注射2時間後の血液中のリボソーム濃度は、5および7.5モル%のガングリオシドを含有するリボソームにおいては、総注

入カウントの約10%程度まで増大した。同時に、肝臓の取込み量は、5および7.5モル%のガングリオシドのときに、最低のレベルであることが観察された。しかし、このレベルは、総注射カウントの30%よりも大きかった。

これには対照的に、第2図Bを参照すると、GN<sub>1</sub>量を約2.5モル%を超えて増加させると、血液中のカウントのパーセントが増大して50%を超えた。一方、全肝臓取込み量は、約10%未満に減少した。この結果は、膜を強化させる成分 (この場合はSH) が、GN<sub>1</sub>の血液/RES比に対する影響に重要であることを示す。さらにこの結果は、リボソーム中の最適GN<sub>1</sub>濃度が約7.5~15.0モル%であることも示している。

#### 実施例7

##### 血液/RESに対する糖および負荷電基の影響

表3に示す18個の異なる組成物の一つを含有し、サイズを調整されたREVを調整し、種々の糖および/または負荷電基の血液/RESレベルに対する影響を、リボソームを投与2時間後に測定した。各組成物には、PC:CB, 2:1と、1種以上の糖脂質もしくは負荷電脂質の0.2モル%を含有させた。使用した種々の荷電物質および/または糖物質は次のとおりである：モノガラクトシルスチアレート、ガラクトース残基に荷電サルフェート基を有するスルファチド (SULF; 第5図C)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA)、トリヘキソシドセラミド類 (CIRI)、3個のヘキソース単位を有する非荷電糖脂質：ジガラクトシルジグリセリド (DG DG)。

2個のガラクトシル残基を有する非荷電糖脂質；モノガラクトシルジグリセリド (MGDG)、単一のガラクトシル残基を有する非荷電糖脂質；ガラクトセレブロシド (GAL)、単一のガラクトシル残基を有する非荷電糖脂質；グロボシド (GLOB)、4個の糖残基を有する非荷電糖脂質；アシアロガングリオリシド (ASGM)；およびグリコセレブロシド (GLU)、単一のグルコース残基を有する非荷電糖脂質。

セル組成および注射2時間後に測定した血液/RES比を下記の表3に示す。PCおよびCBとを含有する組成物において、GM<sub>1</sub>のみ、またはGM<sub>1</sub>と組合わせてGALもしくはGLUを含有する組成物は、PC:CB リボソームの場合よりは有意に大きい血液/RES値を示した。PCおよびPAは、両者ともに、血液/RES比を低下させ、PSは血液/RESを著しく低下させた。

SHとPCとを含有する組成物においては、モノガラクトシルステアレート (SULF) が、PC:CB:GM<sub>1</sub> 配合物に匹敵する値を示した。

(以下余白)

表3

脂質組成 <sup>a</sup>	割合	注射2時間後 の血液/RES比	血液/RES比 (%)
PC:CB, 2:1	0.1 μ	0.58±0.15	53.3±6.8
PC:CB:SULF, 2:1:0.2	0.1 μ	0.54±0.22	53.3±1.3
PC:CB:PS, 2:1:0.2	0.1 μ	0.02±0.00	79.2±7.2
PC:CB:PA, 2:1:0.2	0.1 μ	0.09±0.01	62.6±2.2
PC:CB:CTR1, 2:1:0.2	0.1 μ	0.15±0.02	81.7±2.3
PC:CB:DCDG, 2:1:0.2	0.1 μ	0.14±0.44	43.2±7.2
PC:CB:MGDG, 2:1:0.2	0.1 μ	0.31±0.08	67.4±3.2
PC:CB:GAL, 2:1:0.2	0.1 μ	1.01±0.03	87.1±0.2
PC:CB:GLOB, 2:1:0.2	0.1 μ	0.08±0.03	74.2±2.1
PC:CB:ASGM, 2:1:0.2	0.1 μ	0.46±0.01	75.2±8.1
PC:CB:GLU, 2:1:0.2	0.1 μ	0.72±0.21	84.6±12.1
PC:CB:GM <sub>1</sub> , 2:1:0.2	0.1 μ	4.3±1.1	75.9±3.1
PC:CB:GAL:GM <sub>1</sub> , 2:1:0.2	0.1 μ	5.95±1.42	56.8±5.0
PC:CB:GLU:GM <sub>1</sub> , 2:1:0.2	0.1 μ	3.88±0.91	81.3±3.3
SH:PC, 1:1	0.2 μ	2.14±1.36	72.05±5.57
SH:PC:SULF, 1:1:0.2	0.2 μ	3.08±3.41	82.4±10.8
SH:PC:PA, 1:1:0.2	0.2 μ	1.20±0.31	74.4±2.9
SH:PC:PS, 1:1:0.2	0.2 μ	0.02±0.00	81.3±1.8

PC:CB, 4:1 で構成され、下記のガングリオリシドもしくは修飾ガングリオリシド類の1種の0.35モル%を含み、サイズを調整された (0.17 μm) REV の注射2時間後に、血液/RES値を測定した。ガングリオリシドもしくは修飾ガングリオリシド類には、GM<sub>1</sub>:1個のほとんど荷電していない末端糖残基を有するGM<sub>2</sub>:2個のほとんど荷電していない糖残基を有するGM<sub>3</sub>:ジシアロガングリオリシド (GD<sub>3</sub>) (その4つの糖残基は2個のシアル酸残基を有する)；そして、トリシアロガングリオリシド (GT<sub>3</sub>) (その4つの糖残基は2個のシアル酸残基を有する) がある。血液/RES比を下記の表4に示す。表からわかるように、GM<sub>1</sub>、ガングリオリシドだけが、高い血液/RES比を示す

表4

脂質組成物	血液/RES
SH:PC:GM <sub>1</sub>	3.3(0.3)
SH:PC:GM <sub>2</sub>	0.6(0.3)
SH:PC:GM <sub>3</sub>	0.3(0.2)
SH:PC:GD <sub>3</sub>	0.6(0.3)
SH:PC:GT <sub>3</sub>	0.3(0.3)
SH:PC:ASGM <sub>1</sub>	0.9(0.5)

#### 実施例8

##### 注射4時間後のリボソームの分布

25mMのデスフェラルを含有する水和懸濁液を用いて実施例1と同様に、HLVを調製した。脂質組成物を下記表5の左に示し、その調りの値に相対モル量を示す。これらHLVを実施例1と同様に押出して、サイズ範囲を約0.07~1.12 μmとし、遊離のデスフェラルをセフデックスC-75のカラムクロマトグラフィーで除去した。

動物に注射する第1日前に、<sup>67</sup>Gaリウム/8-ヒドロキシキノリンの複合体 (弱酸性のキレート化剤) を、リボソームの懸濁液に添加した。この複合体がリボソームを透過するとき、カプセル化されたデスフェラルの<sup>67</sup>Gaの移動が起こる。得られた<sup>67</sup>Ga-デスフェラル複合体は、高い親和力を有するので、トランスフェリンあるいは他の金属結合タンパクによって置換され得ない。この複合体は、リボソームから放出されると、数分間の半減期で尿によって速やかに排泄される。注射する直前に、リボソームを陰イオン交換樹脂 (AG-1×4 アセテート型) を通過させて、カプセル化されていない<sup>67</sup>Ga

-8-ヒドロキシキノリン複合体のすべてを完全に除去する。

年齢と性別とを一致させたマウス群に、下記表5に示す脂質組成物の1種を含有するリボソーム調製物を、尾の静脈から注射した。注射4時間後に、血液および肝臓と脾臓とを含む解剖された身体部分の放射能 (カウント/分) を、10~1000keVの間での積分カウンティング法を用いるガンマ線カウンティングによって測定した。血液総カウント数を、推定全血液容量に基づいて前記のようにして測定した。全回収率 (%) は、全身のガンマ線カウント数によって測定した (全身カウント数×100 / 注射されたカウント数)。

血液/RES比は、総血液カウント数を、肝臓および脾臓の総カウント数の合計で割ることにより、前記と同様にして算出した。その結果を表5に示す。表からわかるように、GM<sub>1</sub>、ガングリオリシドと水素化PI (HPI) とは、飽和PC、または飽和PC+SHを含有するリボソームに比較的高い血液/RES比を与えた。不飽和リボソーム配合物中の上記と同様のガングリオリシドまたはSULF、または不飽和配合物中のHPIは、実質的に低い値を与えた。

(以下余白)

表 5

リボソーム組成物	成分の モル比	血液/RES 比	全身回収率(%)
PG:PC:CH	1:10:5	.083	76.1(0.8)
PG:PC:CH (押出しを行っていない)	1:10:5	.006	55.8(2.9)
GN:PC:CH	1:10:5	1.1	63.2(2.0)
SULF:PC:CH	1:10:5	1.1	61.0(0.8)
DPPG:DSPC:CH	1:10:5	2.0	88.6(6.1)
PI:PC:CH	1:10:5	.89	49.0(8.3)
BP1:DSPC:CH	1:10:5	2.5	78.7(1.5)
GN:SN:DSPC:CH	1:8:2:5	5	50.3(3.4)
GN:DSPC:CH	1:10:5	5	88.5(1.2)
GL:PC:CH	1:10:5	.02	--
GT:PC:CH	1:10:5	.185	--

(以下余白)

実験例 9

## 注射後24時間経過時のリボソームの分布

表 6 に示す脂質組成物を含有し、<sup>32</sup>P-リボソーム/デスフェラル複合体をカプセル化している、サイズを調整したHLV を実施例 8 と同様にして調製した。上記の方法により決定した血液/RES 比と全身回収率(%)とを、表の右側に示す。GN、BP1 および SULF を DSPC および SN のような飽和中性脂質成分と組み合わせると、24 時間経過した時点で最悪の血液/RES 比が得られるということをデータは示している。

負に荷電している成分が PG もしくは DSPG の場合には、低い血液/RES 値が得られ、これら成分の負の荷電は、比較的小さなグリセロール基で保護され、そして、負に荷電している成分がコレステロールサルフェート (CS) の場合には、その荷電サルフェート基は保護されていない。

(以下余白)

表 6

REV-A 組成	成分の モル比	血液/RES 比	全身回収率(%)
GT:PC:CH	1:10:5	0.004	58.2(8.8)
PG:PC:CH (押出しを行っていない)	1:10:5	0.004	31.3(1.5)
GL:PC:CH	1:10:5	.008	34.3(3.2)
PG:PC:CH	1:10:5	.008	49.8(3.9)
DSPC:CH	1:10:5	.014	67.6(4.2)
SULF:PC:CH	1:10:5	.02	41.6(2.5)
SN:PC:CH	8:2:5	.03	21.9(1.4)
SN:PC	8:2	.03	6.3(1.2)
BP1:DSPC:CH	1:10:5	.06	46.3(1.8)
CHS:DSPC:CH	1:10:5	.08	55.6(6.0)
GN:SN:PC	1:8:2	.1	15.1(0.5)
PC:CH	10:5	.11	44.4(2.9)
GN:SN:PC:CH	1:8:2:5	.12	14.4(1.9)
DPPG:DSPC:CH	1:10:5	.2	59.9(5.5)
PG:DSPC:CH	1:10:5	.2	12.9(1.4)
PI:PC:CH	1:10:5	.28	37.4(8.3)
SULF:DSPC:CH	1:10:5	.3	57.5(3.7)
GN:PC:CH	1:10:5	.33	40.3(1.5)
BP1:DSPC:CH	1:10:5	.43	61.6(4.0)
GN:SN:DSPC:CH	1:8:2:5	.6	26.9(5.8)
BP1:BP:CH	1:10:5	.55	51.1(6.7)
GN:DSPC:CH	1:10:5	.9	66.3(4.2)

また、配合物が異なると24時間後の全身回収率が変化するということも重要である。全身回収率(%)と、血液値または RES 値との関係、またはそれらの比に明確な関係はないが、脂質成分が広範囲に変化する相転移温度(Tp)を有する場合、配合物の多くは比較的低い回収率を示した。したがって、例えば、SN(Tpが約30℃)およびDSPC(Tpが約50℃)を含有するGN、配合物は、注射後4時間経過時点で観察したところ、SNを含有しないGN、配合物よりもはるかに低い回収率を示した。更に、SNと卵PC(Tpが約0℃)とを含有する、ガ

ングリオシドもしくは非ガングリオシド配合物が、コレステロールを含有していてもいなくても低い回収率を示したのは一層驚くべきことであった。

注射後24時間経過時点で血液、肝臓および脾臓に含有される放射能レベル(リボソームのマーカー)を、下記表7の右側に示した数種のリボソーム組成物について測定した。これらのレベルは、2、4および24時間経過した時点で測定したレベルについて、曲線下面積(AUC)として決定したものであり、従って、注射後24時間経過時点までの期間の組織(血液、肝臓もしくは脾臓)中に存在するマーカーの全レベルに關係している。

表から分かるように、GN、もしくはBP1を含有する配合物には、高いAUC 血液/肝臓比が認められ、一方、PGもしくはDPPGを含有する配合物については、上記の比率がはるかに低く、このことは、表6における血液/RES 比の値と一致している。

表 7

REV-A 組成	成分の モル比	血液 肝臓 (AUC)	血液/肝臓 AUC 比
PG:PC:CH	1:10:5	0.52 7.34	.07
DPPG:DSPC:CH	1:10:5	3.52 4.27	.82
GN:PC:CH	1:10:5	2.86 1.68	1.58
GN:SN:DSPC:CH	1:8:2:5	2.21 1.76	1.25
GN:DSPC:CH	1:10:5	5.84 1.95	3.0
BP1:DSPC:CH	1:10:5	3.82 3.31	1.15

リボソームの血中レベルとREV レベルとの間に統計上有意

な相関関係があるかを調べるために、最小2乗法を用いて、データの線形回帰分析を行なった。第3図Aは、血中レベルとRESの取込みとの間に逆(負)相関関係があることを示している( $r = -0.88$ ,  $p = 0.00002$ )。これらの数値は表6の数値を採用した。

#### 実施例10

##### 血液/RES比に対する脂肪の影響

下記表8に示すように、BPI またはPIと、DSPCもしくはPCのいずれか一方と、コレステロールとを含有し、BPI またはPIのモル量が増大するように変化させ、そして、サイズ調整したHLVを上記の方法により調製し、注射後24時間経過時または4時間経過時の血液/RES比および全身総回収率について調べた。表8から分かるように、BPIのモル百分率を約6%から16%に増大しても血液/RES比はほとんど変化しなかったが、16%から30%に増大させると著しく低下した。血液/RES比の同様の低下は、PI配合物についても、注射後4時間および24時間経過時点の両時点で観察された。PIもしくはBPIの割合(%)は、注射後4時間経過時または24時間経過時の全身総回収率には大きな影響を与えなかった。

(以下余白)

ソームは、カプセル化されたガリウム/デスフェラル複合体で上記の方法により調製され、主として0.07~0.12 $\mu$ mの範囲のサイズを有する、サイズ調整されたHLVであった。

リボソーム投与後24時間経過時点で、動物を完全に解剖した。表に示した数値は、 $^{67}$ ガリウムのカウントに基づき、組織の血液含有量について補正される。正常な組織および腫瘍における血液含有量についての補正係数を、年令および性別を一致させ、腫瘍を有するマウスの $^{67}$ Ga-オキシシチンで標識した赤血球の分布を調べることにより算定した。比率は、各組織の1gにつき注射投与量の割合(%)を計算することによって得られた。全身平均とは、体重1g当りの平均リボソーム取り込み量を示し、全身(腫瘍を含む)で回収された注射投与量の%値を動物の体重で割り算することによって算出された。

表9のデータから分かるように、J6456を注射されたマウスについて、インビトロで長時間循環するよう選択されたリボソームを用いた場合、腫瘍の取り込み量が著実に(25倍まで)増大することが認められた。注射投与量の約4~6%という数値が、GH、ガングリオシド含有の配合物または脂肪リン脂質と組合わせたBPIについて得られた。これらの値は、上記の方法により、腫瘍中の血液容積について補正した後に得たものである。遊離の $^{67}$ ガリウム-デスフェラル複合体を注射した際、腫瘍のマーカ取り込み量は、1g当りの注射投与量の0.1%より少なかった。表中の右側のデータは肝臓対腫瘍

表8

167-1 組成	成分のモル比	%PG	血液/RES 比	全身回収率(%)
24hrs				
BPI: DSPC: CH	1:10:5	8.3	.55	62.2(6.0)
BPI: DSPC: CH	2.5:7.5:5	16.7	.45	59.9(3.5)
BPI: DSPC: CH	4.5:5.5:5	30.0	.008	48.3(1.5)
PI: PC: CH	1:10:5	6.3	.27	37.4(6.3)
PI: PC: CH	4:6:5	26.7	.03	53.4(15.3)
4hrs				
PI: PC: CH	1:10:5	8.3	.83	49.0(8.3)
PI: PC: CH	4:6:5	26.7	.07	72.4(2.3)

#### 実施例11

##### リボソームのマーカのマウス腫瘍への取込み

動物に、J6456もしくはB16の腫瘍細胞系を接種した。J6456系はT細胞由来のリンパ腫(Cab120)であり、インビトロでは細胞懸液で増殖し、腹腔内注射のち、腹水腫瘍として増殖する。静脈注射後、これは、主として肝臓および脾臓に転移する。B16黒色腫細胞系は、インビトロでは結核性腫瘍として増殖する神経外胚葉由来の固形腫瘍があり、主として肺に転移する。

腫瘍細胞( $10^6$ のJ6456細胞または $5 \times 10^5$ のB16細胞)を、同系の(C57BL/6またはB6129/c)の雄のマウスの後足の筋肉内に接種した。接種後2週間から3週間経過し、腫瘍が約0.5~2gになった時に、下記の表9に示すリボソーム組成物の一種をリン脂質が1 $\mu$ molとなる量を静脈注射した。成分のモル比は、同じ脂質成分の配合物と同じである。リボ

比が同時に減少することを示し、リボソームが全身の組織中で非特異的に増大するのではなく、腫瘍中に選択的に蓄積することを示している。またGH、またはBPI配合物についても腫瘍対身体比が漸次高くなることが認められた(記載せず)。

表9

##### 注射投与量の割合(%) / 6(SD)

167-1 組成	腫瘍	肝臓	全身平均	腫瘍/全身平均	肝臓/腫瘍比
PG: PC: CH	0.2(0.0)	36.4(8.3)	2.9(0.7)	0.1	182.0
PG: PC: CH	0.8	21.4	2.3	0.1	71.3
(排出し処理せず)					
SULF: PC: CH	0.8	13.6	2.0	0.4	17.0
DSPC: CH	2.1(0.3)	36.5(7.5)	2.8(0.3)	0.8	17.4
SULF: DSPC: CH	2.1(0.3)	32.1(4.5)	2.1(0.1)	1.0	15.3
CH: DSPC: CH	2.5(0.1)	29.7(1.4)	2.3(0.2)	1.1	11.9
BPI: DSPC: CH	4.1(1.1)	37.8(0.4)	3.0(0.2)	1.4	8.2
DPPG: DSPC: CH	4.1(1.6)	38.3(0.5)	2.8(0.1)	1.5	8.8
GR: DSPC: CH	5.3(0.8)	31.7(1.4)	3.3(0.1)	1.6	6.0
GR: PC: CH	3.5(0.6)	20.8(0.8)	2.4(0.2)	1.5	5.9

B16を接種した動物の腫瘍の取込み量のデータから、表10に示すように、同様な結果が得られたが、リボソーム組成に関連した腫瘍取り込み量の増加は必ず顕著ではない。

(以下余白)

表10  
注射投与量の割合 (%) / (SD)

投与組成	腫瘍	肝臓	全身	腫瘍/全身比	肝臓/全身比
GH <sub>1</sub> :PC:CH	2.5(0.7)	24.3(1.3)	2.5(0.1)	1.0	9.7
SULP:DSPC:CH	3.6(0.8)	23.5(1.4)	3.1(0.3)	1.2	8.5
PG:DSPC:CH	1.5(0.4)	9.8(0.6)	1.2(0.2)	1.3	6.5
DSPC:CH	6.4	33.2	4.2	1.6	9.1
CHS:DSPC:CH	3.7(0.5)	21.1(1.9)	3.5(0.2)	1.3	9.1
DPPG:DSPC:CH	4.9(0.3)	17.8(2.2)	2.9(0.1)	1.7	3.6
GH <sub>1</sub> :DSPC:CH	8.4(0.3)	37.2(7.2)	4.4(0.4)	1.9	4.4
HP1:DSPC:CH (1:10:5)	5.3(0.3)	14.1(0.3)	2.9(0.1)	1.8	2.7
HP1:DSPC:CH (2.5:7.5:5)	5.2(1.5)	19.7(2.1)	3.3(0.3)	1.6	3.8
HP1:DSPC:CH (4.5:5.5:5)	.3(1)	44.1(1.9)	2.9(0.1)	0.1	147.0

最小2乗法を用いて、データの線形回帰分析を行い、統計上有意な相関関係がリボソームの血中レベルと腫瘍取り込み量との間に存在するかどうかを決定した。第8図Bは、リボソームの血中レベルと腫瘍取り込み量との間に直接(正の)相関関係が、J6456接種の動物(黒三角)とB16接種の動物(黒丸)との両方にあることを示している。J6456接種動物についての相関係数は $r=0.89$ および $p=0.0005$ であり、B16接種動物についての相関係数は $r=0.91$ および $p=0.004$ である。

## 実施例12

## インジウムで標識したブレオマイシンのマウス腫瘍への取り込み

GH<sub>1</sub>:DSPC:CH(1:10:5)で構成され、カプセル化された<sup>111</sup>In-

表12  
投与量割合(X)/組織

組織	遊離 <sup>111</sup> In-ブレオマイシン	167-リン <sup>111</sup> In-ブレオマイシン
腫瘍	0.3(0.0)	9.2(1.9)
血液	0.1(0.0)	7.4(0.8)
肝臓	0.4(0.0)	23.0(1.1)
全身平均	0.2(0.0)	4.0(0.3)

カプセル化された<sup>111</sup>In-ブレオマイシンを有する、サイズを調整したHP1:DSPC:CH(1:10:5)のリボソームを上記の方法により調製し、上記の方法によりJ6456腫瘍細胞を接種したマウスに静脈注射した。マウスを、4、24および48時間経過した時点で殺し、腫瘍、血液および肝臓の放射能レベルを測定し、結果を下記表13に示した。腫瘍の血中レベルは、4~48時間の試験期間に急速に低下した。肝臓と腫瘍については、24時間経過した時点で最適なレベルが観察されたが、4時間および48時間経過時におけるレベルは比較的に高かった。

表13  
投与量割合(X)/組織

組織	4時間	24時間	48時間
血液	47.9(2.5)	8 (1.5)	0.7(0.1)
肝臓	20.4(1.6)	30.6(1.4)	21.4(0.8)
腫瘍	7.8(1.2)	13.7(1.1)	10.5(0.7)

## 実施例13

## J6456 マウス腫瘍へのドキソルビシンの取り込み

ブレオマイシンを含有する、サイズを調整したHLVを上記の方法により調製した。リボソーム投与の1日前に<sup>111</sup>In-ブレオマイシンリボソームの懸濁液に加えることによって、ブレオマイシンを<sup>111</sup>In-ブレオマイシン複合体を形成した。使用直前にこのリボソームを上記の方法により陰イオン交換樹脂を通過させ、カプセル化されていない<sup>111</sup>Inを除いた。

J6456リンパ腫またはB16細胞を接種したマウスに、リボソーム(1  $\mu$ mol)リン脂質/動物)または等量の遊離<sup>111</sup>In-ブレオマイシンを静脈注射した。投与後24時間経過時の放射能の組織への分布状態を上記の方法により測定して、結果を表11(J6456を感染させた動物)および表12(B16を感染させた動物)に示した。表から分かるように、リボソームの形で調製した薬剤は、遊離の薬剤よりも薬剤量を10~30倍増加させた。

表11  
投与量割合(X)/組織

組織	遊離 <sup>111</sup> In-ブレオマイシン	<sup>111</sup> In-ブレオマイシン
腫瘍	0.7	8.2(1.5)
血液	0.8	2.5(0.9)
肝臓	0.9	44.9(8.6)
全身平均	0.5	4.3(0.3)

下記表14に示す三つの脂質組成物の一つを有する、サイズを調整したHLVを上記の方法により調製した。ドキソルビシンを、水和緩衝液に約5  $\mu$ g/mlの濃度まで添加し、遊離の薬剤をゲル濾過によって、サイズを調整したリボソームから除去した。

J6456リンパ腫細胞を接種したマウスに、HLV(1  $\mu$ mol)リン脂質/動物)または等量の遊離のドキソルビシンを静脈注射した。注射後24時間経過時点での該薬剤の組織への分布状態を、蛍光分析法で測定して結果を下記表13に示した。表13から分かるように、腫瘍1:当りの投与量の割合(X)として示した該薬剤の組織中のレベルは、2つのリボソーム組成物(PG:PC:CHおよびGH<sub>1</sub>:PG:PC:CH)に対する遊離の薬剤に類似しているが、これらの組成によって血液/RES比が有意に増大しない。一方、腫瘍中の薬剤レベルは、最適な血液/RES比を示すリボソーム(GH<sub>1</sub>:DSPC:CH)によって3~6倍増大した。

表14  
投与量割合(X)(DXR)/腫瘍(SD)

遊離のDXR	0.4(0.1)
PG:PC:CH(DXR)(1:10:5)	0.2(0.0)
GH <sub>1</sub> :PG:PC:CH(DXR)(1:10:5)	0.2(0.0)
GH <sub>1</sub> :DSPC:CH(DXR)(1:10:5)	1.3(0.1)

本発明のリボソームを調製および使用する特定の方法がここで説明されているが、種々の異なる脂質組成物、薬剤-リボソーム配合物およびリボソームによる治療法が本発明の範

図内で実施されうることは明らかである。

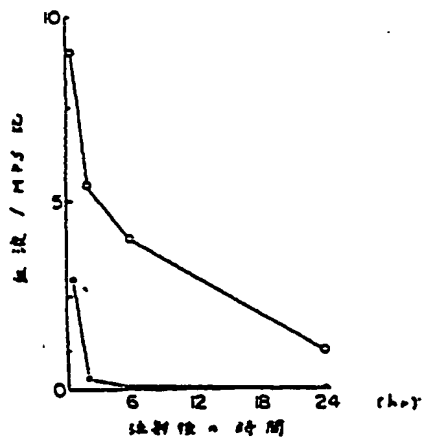


FIG. 1

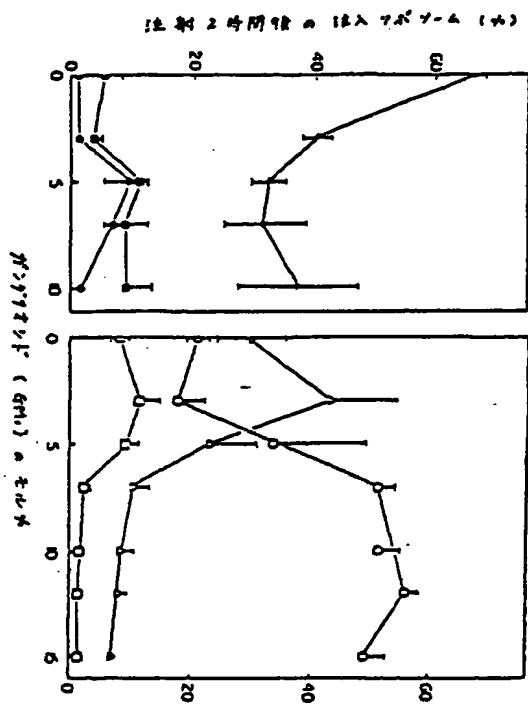


FIG. 2A

FIG. 2B

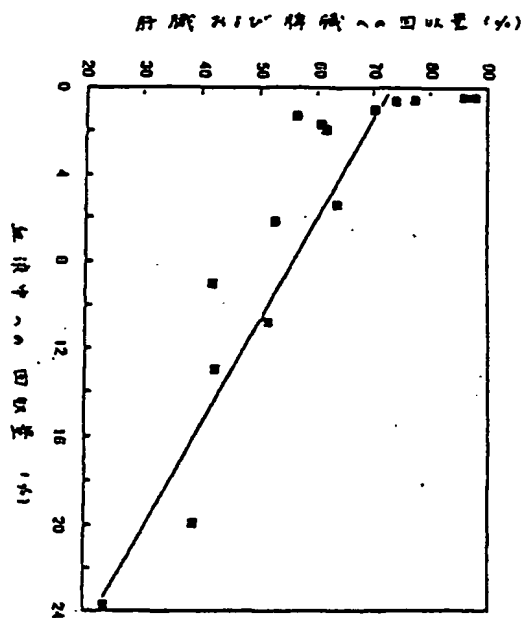
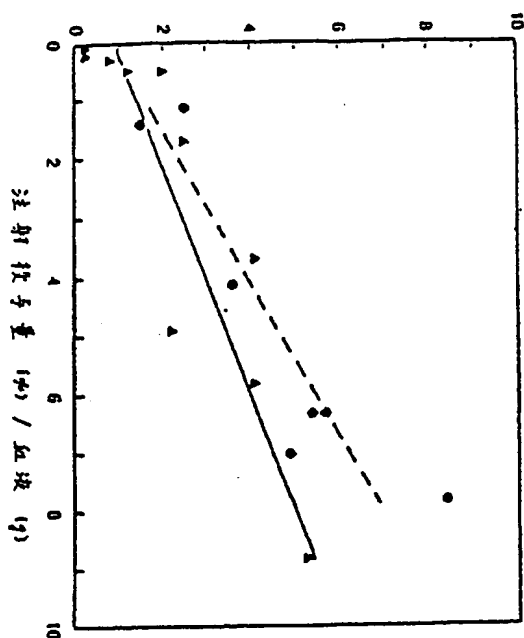


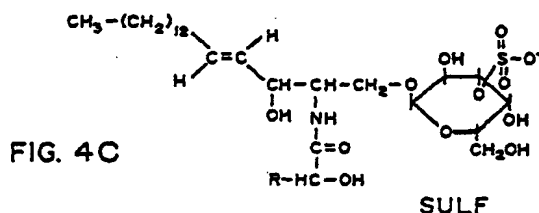
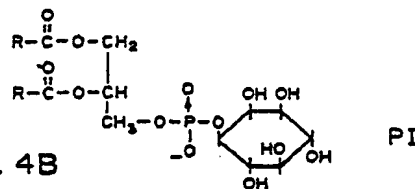
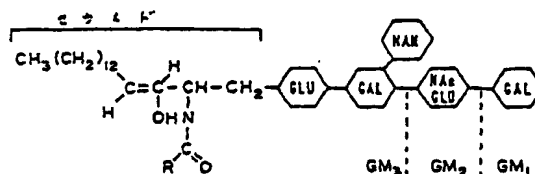
FIG. 3A



注射剂量 (μ) / 腫瘍 (g)



**FIG. 3B**



總 經 銷 東 亞 實 業

[illegible][illegible]

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**